

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-14044

(P2002-14044A)

(43) 公開日 平成14年1月18日 (2002.1.18)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマト\* (参考)

G 0 1 N 21/64  
21/03

G 0 1 N 21/64  
21/03

Z 2 G 0 4 3  
Z 2 G 0 5 7

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2000-196179 (P2000-196179)

(22) 出願日 平成12年6月29日 (2000.6.29)

(71) 出願人 000004112

株式会社ニコン

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号

(72) 発明者 大瀧 達朗

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株  
式会社ニコン内

(74) 代理人 100072718

弁理士 古谷 史旺

Fターム(参考) 2G043 BA16 CA03 DA02 DA06 EA01

FA01 CA02 GB01 GB03 GB21

HA01 HA02 HA09 HA11 JA03

LA01 MA16

2G057 AA04 AB06 BA01 BD06 DB01

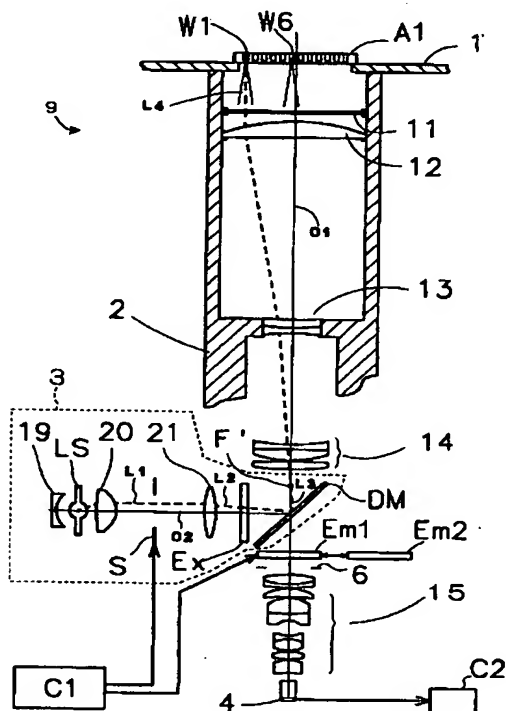
DB02

(54) 【発明の名称】 蛍光測定装置

(57) 【要約】

【課題】 複数のウェルを任意の深さで横切る仮想面（ウェルプレートの下面に平行な面）においても均一な照明状態が得られ、また、サンプルの退色現象を回避することもできる蛍光測定装置を提供すること。

【解決手段】 複数のウェル(W1…W6…)の中に注入された測定対象物から発生する蛍光を測定する蛍光測定装置において、複数のウェルの中の測定対象物を一括で照明する照明光学系(3, 12～14)と、照明光学系によって照明された測定対象物からの蛍光を集光して縮小像を形成する結像光学系(12～15)と、結像光学系によって形成された縮小像を光電的に検出する光電検出手段(4)とを備える。さらに、照明光学系は、ウェルの深さ方向に平行な平行光を用いて測定対象物をテレセントリック照明する光学系である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 複数のウェルの中に注入された測定対象物から発生する蛍光を測定する蛍光測定装置において、前記複数のウェルの中の前記測定対象物を一括で照明する照明光学系と、

前記照明光学系によって照明された前記測定対象物からの蛍光を集光して縮小像を形成する結像光学系と、前記結像光学系によって形成された前記縮小像を光電的に検出する光電検出手段とを備え、

前記照明光学系は、前記ウェルの深さ方向に平行な平行光を用いて前記測定対象物をテレセントリック照明することを特徴とした蛍光測定装置。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の蛍光測定装置において、

前記結像光学系は、前記ウェル側にテレセントリックな光学系である第 1 対物レンズ系と、該第 1 対物レンズ系からの光を集光して前記縮小像を形成する第 2 対物レンズ系とを有し、

前記照明光学系は、光源と、該光源の像を前記第 1 対物レンズ系の後側焦点面近傍に形成する光学系とを有し、前記第 1 対物レンズ系を介して前記測定対象物をテレセントリック照明することを特徴とする蛍光測定装置。

【請求項 3】 請求項 1 または請求項 2 に記載の蛍光測定装置において、

前記照明光学系による照明光路上に、前記複数のウェルに対応する複数の開口部が設けられた光学部材を配置したことを特徴とする蛍光測定装置。

【請求項 4】 複数のウェルの中に注入された測定対象物から発生する蛍光を測定する蛍光測定装置において、前記複数のウェルの中の前記測定対象物を一括で照明する照明光学系と、

前記照明光学系によって照明された前記測定対象物からの蛍光を集光して縮小像を形成する結像光学系と、前記結像光学系によって形成された前記縮小像を光電的に検出する光電検出手段とを備え、

前記照明光学系には、前記測定対象物への照明時間を制限する制限手段が設けられることを特徴とする蛍光測定装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、サンプル収容凹部（ウェル）の中に注入されたサンプルから発生する蛍光を測光分析する蛍光測定装置に関し、特に試薬を混ぜたときにサンプルから発生する蛍光を測光分析する蛍光測定装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来より、複数のウェルが設けられたウェルプレートを用い、各ウェルの中に注入されたサンプル（例えば細胞）に試薬を混ぜ、この状態のウェルプレートを照明したときに発生する蛍光を測光分析する蛍光

測定装置が知られている。この蛍光測定装置では、縮小倍率を有する結像光学系を介して蛍光による縮小像を形成し、縮小像の画像情報に基づいて測光分析を行う。

【0003】 また、ウェルプレートを照明する際の照明むらを少なくするために、ウェルプレートを斜め下方からではなく真下から照明する蛍光測定装置も提案されている（例えば特開平 10-197449 号公報）。照明むらを少なくできれば、各ウェルの位置による測定精度のばらつきを少なくすることができる。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、各ウェルは深さ方向（ウェルプレートの厚さ方向）に細長い（深さは 5 mm 程度）。このため、単に真下から照明する従来の構成では、ウェルプレートの下面（各ウェルの底面）近傍での照明むらを少なくすることはできても、ウェルプレートの下面に平行で各ウェルを横切る任意の仮想面において照明むらが少なくなる保証はなかった。つまり、単に真下から照明する従来の構成では、各ウェルの深さ方向も含めた照明の均一性は得られなかった。その結果、各ウェルの位置による測定精度のばらつき改善に限界があった。

【0005】 また、ウェルプレートを長時間にわたって照明し続けるため、サンプルから発生する蛍光が時間の経過とともに弱くなる退色現象が生じてしまうという問題もあった。本発明の目的は、複数のウェルを任意の深さで横切る仮想面（ウェルプレートの下面に平行な面）においても均一な照明状態が得られ、また、サンプルの退色現象を回避することもできる蛍光測定装置を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、複数のウェル（W1…W6…）の中に注入された測定対象物から発生する蛍光を測定する蛍光測定装置（10）において、複数のウェルの中の測定対象物を一括で照明する照明光学系（3, 12～14）と、照明光学系によって照明された測定対象物からの蛍光を集光して縮小像を形成する結像光学系（12～15）と、結像光学系によって形成された縮小像を光電的に検出する光電検出手段（4）とを備えたものである。さらに、照明光学系は、ウェルの深さ方向に平行な平行光を用いて測定対象物をテレセントリック照明する光学系である。

【0007】 このように、複数のウェルの中の測定対象物を一括でテレセントリック照明するため、複数のウェルを任意の深さで横切る仮想面においても、各ウェルの位置に関わらず均一な照明状態が得られる。また、本発明は、複数のウェルの中に注入された測定対象物から発生する蛍光を測定する蛍光測定装置において、複数のウェルの中の測定対象物を一括で照明する照明光学系と、照明光学系によって照明された測定対象物からの蛍光を集光して縮小像を形成する結像光学系と、結像光学系に

よって形成された縮小像を光電的に検出する光電検出手段とを備えたものである。さらに、照明光学系には、測定対象物への照明時間を制限する制限手段(S)を設ける。

【0008】このように、複数のウエルの中の測定対象物を一括で照明するに当たって、その照明時間を制限するため、サンプルの退色現象を回避できる。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、図面を用いて本発明の実施形態を詳細に説明する。

【0010】本実施形態は、請求項1、請求項2、請求項4に対応する。本実施形態の蛍光測定装置10は、図1に示すように、ウエルプレートA1、A2を支持するステージ1と、ステージ1の上部を覆う遮光部材7と、遮光部材7の内部に設けられた分注器8と、ステージ1の下方に設けられた照明検出部9と、制御装置C1、C3と、処理装置C2とで構成されている。

【0011】ここで、ウエルプレートA1、A2には、複数（例えば96個）のウエルW1…W6…がマトリクス状に配置されている。各ウエルW1…W6…の深さ方向はウエルプレートA1、A2の厚さ方向に等しい。各ウエルW1…W6…は深さ方向に細長い（深さは5mm程度）。ウエルプレートA1、A2の下面（ウエルW1…W6…の底面）は、光透過性の部材（例えばガラス）で構成されている。ウエルプレートA1、A2の大きさは、80mm×120mm程度である。

【0012】上記ウエルプレートA1、A2の各ウエルW1…W6…の中には、測定対象物であるサンプル（例えば細胞）が注入されている。さて、複数のウエルW1…W6…の中に注入されたサンプルから発生する蛍光を測定する本実施形態の蛍光測定装置10において、ステージ1には、測定位置（図1におけるウエルプレートA1の位置）に開口部1aが設けられている。開口部1aの大きさは、複数のウエルW1…W6…が配置された範囲より大きい。また、ステージ1には、ウエルプレートA1、A2を移動させるウエルプレート移動機構（不図示）と、測定位置にウエルプレートA1が位置決めされたことを検知するセンサ1bとが設けられている。

【0013】遮光部材7は、外部からの光を遮断する部材であり、内部を暗室に保つと共に、二酸化炭素などの雰囲気や温度を保つ機能を兼ねている。分注器8は、ステージ1の測定位置から外れた準備位置（ウエルプレートA2の位置）の上方に配置されている。分注器8は、準備位置に位置決めされたウエルプレートA2の各ウエルW1…W6…の中のサンプルに試薬を注入する装置である。分注器8は、制御装置C3により制御される。

【0014】照明検出部9は、図1、図2に示すように、ウエルプレートA1のウエルW1…W6…の中のサンプルを一括で照明する照明光学系(3, 12~14)と、照明光学系(3, 12~14)によって照明されたサ

ンプルから発生する蛍光を集光して縮小像を形成する結像光学系(12~15)と、結像光学系(12~15)によって形成された縮小像を光電的に検出する光電検出器4と、その他の光学素子(5, 6, 11, 17, Em1, Em2)と、シャッターSと、これらを保持する保持部材2とで構成されている。

【0015】以下、順に、結像光学系(12~15)の構成と、光電検出器4の構成と、照明光学系(3, 12~14)の構成と、シャッターSの構成と、保持部材2の構成とを説明する。その他の光学素子(5, 6, 11, 17, Em1, Em2)については適宜説明する。結像光学系(12~15)は、レンズ群12~14による第1対物レンズ系と、レンズ群15による第2対物レンズ系とで構成され、全体として縮小倍率を有している。

【0016】ここで、第1対物レンズ系(12~14)のレンズ群12とレンズ群13との間には、図1に示すように（図2には図示せず）、結像光学系(12~15)の光路を略垂直方向に折り曲げるミラー17が配置されている。なお、図2では、ミラー17を図示省略したため、結像光学系(12~15)の光路が途中で折り曲げられない直線状に示されている。

【0017】さらに、第1対物レンズ系(12~14)の後側（第2対物レンズ系(15)側）の焦点位置（図2のF'）には、不図示の絞りが配置されている。このため、第1対物レンズ系(12~14)は、ウエル側にテレセントリックな光学系となる。また、第2対物レンズ系(15)の前側（第1対物レンズ系(12~14)側）の焦点位置には、絞り6（図2）が配置されている。このため、第2対物レンズ系(15)は、像側にテレセントリックな光学系となる。

【0018】結像光学系(12~15)の物体面は、ウエルプレートA1の下面（ウエルW1…W6…の底面）近傍に位置する。第1対物レンズ系(12~14)と第2対物レンズ系(15)との間の光路中においては、物体面上の一点からの光が平行光（アフォーカル）となる。このため、第1対物レンズ系(12~14)と第2対物レンズ系(15)との間隔を容易に調整でき、製造上において有利となる。例えば、テレセントリック性の調整が簡単に行える。上記のテレセントリックな光学系によってウエルプレートA1の各ウエルW1…W6…からの蛍光を有効に取り入れるため、結像光学系(12~15)の中で最もウエルプレートA1側のレンズ群12の直径は、ウエルプレートA1の対角長より大きいことが望ましい。ウエルプレートA1の大きさが80mm×120mm程度のとき、対角長は144mm程度であるため、直径150mm以上のレンズ群12を用いれば良い。

【0019】なお、結像光学系(12~15)とウエルプレートA1（ステージ1の開口部1a）との間の光路中には、防塵防滴のための平行平面ガラス11が設けられている。これにより、サンプルや試薬などの液体が光学

系部分に混入することを防止できる。また、第1対物レンズ系(12~14)のレンズ群13とレンズ群14との間には(図1)、縮小像のコントラスト低下の要因となる迷光を減少させるために絞り5が配置されている。

【0020】光電検出器4は、結像光学系(12~15)の像面に形成された縮小像を一括して撮像可能な大きさの撮像面を有する(例えばCCD撮像素子)。光電検出器4によって撮像された縮小像の画像情報は処理装置C2に出力される。照明光学系(3, 12~14)は、図2に示すように、光源LSと、反射ミラー19と、集光レンズ20と、集光レンズ21と、波長選択フィルターExと、ダイクロイックミラーDMと、上記した第1対物レンズ系(12~14)とで構成されている。

【0021】光源LSは、例えば高圧水銀ランプにて構成される。反射ミラー19は、照明効率を高めるための凹面鏡であり、集光レンズ20とは反対側に配置される。集光レンズ20は、光源LSからの拡散光を平行光L1にするレンズである。集光レンズ21は、集光レンズ20からの平行光L1を集光光L2にするレンズである。波長選択フィルターExは、サンプルを励起可能な波長領域に含まれる光を選択的に透過するフィルターである。

【0022】これら光源LS、反射ミラー19、集光レンズ20、集光レンズ21、波長選択フィルターExは、上記した第1対物レンズ系(12~14)の光軸O1に略垂直な光軸O2に沿って配置されている。ダイクロイックミラーDMは、波長選択フィルターExからの透過光(集光光L2)を選択的に反射する(集光光L3)と共に、サンプルからの蛍光を選択的に透過する。このダイクロイックミラーDMは、光軸O1、O2から略45°傾けて、第1対物レンズ系(12~14)と第2対物レンズ系(15)との間(アフォーカル系)の光路中に配置されている。

【0023】さらに、上記の照明光学系(LS, 19, 20, 21, Ex, 12~14)は、集光レンズ21からダイクロイックミラーDMまでの距離と、ダイクロイックミラーDMから第1対物レンズ系(12~14)の後側焦点位置(F')までの距離との和が、集光レンズ21の焦点距離に等しくなるように配置されている。シャッターSは、上記の照明光学系を構成する集光レンズ20と集光レンズ21との間の光路中に配置され、サンプルへの照明光(L1)を通過または遮断させる部材である(例えばフォーカルプレーンシャッター)。シャッターSの開閉は、制御装置C1によって制御される。制御装置C1の制御によってシャッターSを開閉させることで、サンプルへの照明時間を制限することができる。サンプルへの照明時間は、サンプルの退色特性に応じて設定される。

【0024】また、上記のダイクロイックミラーDMと第2対物レンズ系(15)との間(アフォーカル系)の光

路中には、波長選択フィルターEm1、Em2の何れかが配置される。波長選択フィルターEm1は、サンプルからの蛍光のうち所定の波長領域に含まれる光を選択的に透過する。波長選択フィルターEm2は、波長選択フィルターEm1の透過波長領域とは異なる波長領域に含まれる光を選択的に透過する。波長選択フィルターEm1、Em2の交換は、制御装置C1によって制御される。

【0025】保持部材2は、内壁面に、遮光線(細かな溝)が施されると共に、漆など艶消しの塗装が施され、ステージ1の下面に取り付けられている。保持部材2のステージ1側は、開口部1aを囲む大きさに形成されている。なお、図2の保持部材2は、一部、図示省略されている。次に、上記のように構成された蛍光測定装置10における測定動作について説明する。照明光学系を構成する光源LS(例えば高圧水銀ランプ)は、測定動作の開始に先立って予め点灯され、安定状態に保たれている。また、測定動作の開始時点において、照明光学系の光路中に配置されたシャッターSは閉状態に保たれ、サンプルへの照明光が遮断されている。

【0026】遮光部材7の内部において、準備位置のウエルプレートA2は、分注器8から各ウエルW1~W6...の中のサンプルに試薬が注入されたのち、ステージ1上を搬送されて測定位置に位置決めされる(ウエルプレートA1)。このとき、センサ1bは、ウエルプレートA1が測定位置に位置決めされたことを検知して、検知信号を制御装置C1に出力する。

【0027】制御装置C1は、センサ1bからの検知信号に基づいてサンプル認識(図3のS1)を行い、照明光学系のシャッターSを開放する(S2)。これにより、光源LSからの光は、集光レンズ20、21と波長選択フィルターExとダイクロイックミラーDMと第1対物レンズ系(12~14)とを介してウエルプレートA1側に導かれる。つまり、ウエルプレートA1の各ウエルW1~W6...の中のサンプルに対する照明が開始される(S3)。

【0028】ここで、集光レンズ21からの集光光L2は、波長選択フィルターExを介してダイクロイックミラーDMに導かれ、第1対物レンズ系(12~14)の方向に反射する(集光光L3)。上述したように、集光レンズ21から第1対物レンズ系(12~14)の後側焦点位置F'までの距離が集光レンズ21の焦点距離に等しいため、集光光L3は第1対物レンズ系(12~14)の後側焦点位置F'に集光する。すなわち、第1対物レンズ系(12~14)の後側焦点位置F'には、光源LSの像が形成される。

【0029】そして、第1対物レンズ系(12~14)の後側焦点位置F'に集光された光(集光光L3)は、第1対物レンズ系(12~14)を通過したのち、光軸O1に平行な平行光L4となる。この平行光L4の径は、ウ

エルプレートA1のウエルW1…W6…が配置された範囲より大きい。このため、各ウエルW1…W6…の中のサンプルは、中央部に位置するか周辺部に位置するかに関わらず、この平行光L4によって下方から一括で照明される。

【0030】さらに、各ウエルW1…W6…の深さ方向（ウエルプレートA1の厚さ方向）は、光軸O1に平行である。このため、上記のサンプルを照明する平行光L4は、ウエルW1…W6…の深さ方向に平行といえる。つまり、ウエルW1…W6…の中のサンプルは、ウエルW1…W6…の深さ方向に平行な平行光L4によってテレセントリック照明される。したがって、ウエルプレートA1の下面（ウエルW1…W6…の底面）近傍だけでなく、ウエルW1…W6…を任意の深さで横切る仮想面においても、ウエルW1…W6…の位置によらない均一な照明状態が得られる。

【0031】このようにして、ウエルW1…W6…の中のサンプルは、平行光L4によって等しい照明条件で一括にテレセントリック照明され、サンプルの特性に応じて蛍光を発する。各ウエルW1…W6…の中のサンプルからの蛍光は、結像光学系(12~15)を介して集光され、光電検出器4の撮像面に一括して導かれる。ここで、第1対物レンズ系(12~14)がウエル側にテレセントリックな光学系で構成されるため、ウエルプレートA1のどの位置にあるウエルW1…W6…であっても、同じ方向から蛍光を測光することができる。

【0032】また、光電検出器4の撮像面には、サンプルからの蛍光のうち、波長選択フィルターEm1によって選択された波長領域の蛍光による縮小像が形成される。光電検出器4は、撮像面に形成された縮小像の画像情報を処理装置C2に出力する（図3のS4）。制御装置C1は、シャッターSを開放させた時点（S2）から所定の時間（サンプルの退色特性に応じた時間）が経過すると、シャッターSを閉じる（S5）。これにより、光源Lからサンプルへの照明光が遮断される。

【0033】処理装置C2では、光電検出器4から取り込んだ縮小像の画像情報に対して所定の演算処理を行い（S6）、サンプルの特性を求める。また、処理装置C2は、データ表示やデータ記録を行なうコンピュータPCを介してビデオモニターMTRに縮小像を表示させる（S7）。上記した測定動作（図3のS1~S7）では波長選択フィルターEm1によって蛍光の波長領域を選択したが、波長選択フィルターEm1の代わりに波長選択フィルターEm2を配置し、波長選択フィルターEm2によって異なる波長領域の蛍光を選択することもできる。この場合には、異なる波長領域の蛍光に基づく縮小像の画像情報が処理装置C2に出力される。処理装置C2では、異なる2つの波長領域での測定結果を比較することで、サンプルに関する定量的な測光分析が行われる。波長選択フィルターEm1、Em2は、光電検出器

4とダイクロイックミラーDMとの間であればどこに配置しても良い。波長選択フィルターEm1、Em2の代わりに、液晶を用いて透過波長領域を変更するLC TF（Liquid Crystal Tunable Filter）を用いても良い。

【0034】以上説明したように、本実施形態の蛍光測定装置10によれば、ウエルW1…W6…の中のサンプルは等しい照明条件でテレセントリック照明されるため、ウエルW1…W6…の位置による測定精度のばらつきを大幅に改善することができる。また、ウエルW1…W6…の中のサンプルから発生した蛍光は同じ方向から等しい受光条件で効率よく結像光学系(12~15)に導かれるため、ウエルW1…W6…の位置による測定精度のばらつきを更に改善することができる。したがって、ウエルW1…W6…の中のサンプルから発生した蛍光を均一な条件で高精度に測定できる。

【0035】さらに、本実施形態の蛍光測定装置10によれば、ウエルW1…W6…の中のサンプルを一括して照明すると共に、ウエルW1…W6…の中のサンプルから発生した蛍光を一括して撮像するため、大量のサンプルを短時間で効率よく測光分析することができる。また、本実施形態の蛍光測定装置10によれば、照明光学系の光路上に配置したシャッターSの開閉によってサンプルへの照明時間を制限するため、照明光を必要時間のみサンプルに照射することができ、サンプルの退色現象を低く抑えることができる。

【0036】なお、上記した実施形態では、ステージ1に設けたセンサ1bがウエルプレートA1を検知したときにシャッターSを開放する例を説明したが、分注器8からサンプルに試薬が注入されたのち予め定めた時間後にシャッターSを開放させても良い。この場合、試薬の注入からシャッターSの開放までの時間は、例えば、サンプルと試薬との反応時間に応じて設定される。

【0037】また、シャッターSの開放から所定時間（サンプルの退色特性に応じた時間）後にシャッターSを閉じる例を説明したが、所望の測光量が得られた後にシャッターSを閉じていても良い。シャッターSは、光源LとダイクロイックミラーDMとの間であればどこに配置しても良い。さらに、上記した実施形態では、光源Lとして高圧水銀ランプを用いる例を説明したが、レーザーを用いることもできる。この場合には、シャッターSを省略し、レーザー自体のオン/オフまたはレーザー光量の調整によってサンプルへの照明時間を制限することもできる。

【0038】また、上記した蛍光測定装置10の照明光学系(3,12~14)による照明光路上のうち、ウエルプレートA1の下面（各ウエルW1…W2…の底面）に対して共役な面に、図4に示す光学部材41を配置しても良い（請求項3）。光学部材41には、複数の開口部P1…P6…がマトリクス状に配置されている。開口部P1…P6…の数および配置は、ウエルW1…W6…

【図 3】蛍光測定装置 10 における測定動作を説明する図である。

【図 4】 光学部材 41 の構成を示す図である。

【符号の説明】

## 1 ステージ

1 a 開口部

1 b センサ

## 2 保持部材

#### 4 光電檢出器

5, 6 絞り

## 7 遮光部材

## 8 分注器

## 9 照明検出部

## 10 蛍光測定装置

## 1.1 平行平面ガラス

12, 13, 14, 15 レンズ群

17. 19 ミラー

20, 21 集光レンズ

## 4.1 光学部材

A 1, A 2 ウエルプレート

### C 1, C 3 制御装置

## C 2 处理装置

DM ダイクロイックミラー

Ex, Em1, Em2 波長選択フィルター

LS 光源

W 1 ... W 6 ... ウエル

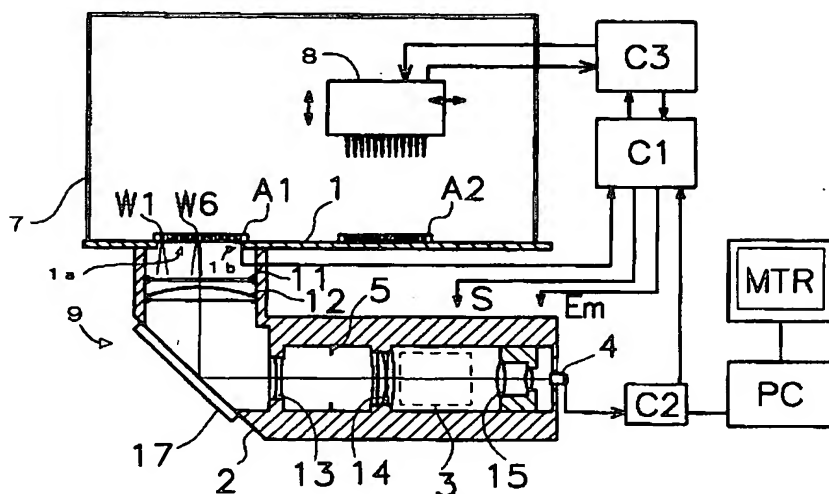
P 1 ... P 6 ... 開口部

S シャッター

【图 3】

```

graph TD
    S1[S1: サンプル取得] --> S2[S2: シャッター開]
    S2 --> S3[S3: サンプルを照明]
    S3 --> S4[S4: 蛍光励光]
    S4 --> S6[S6: シャッター閉]
    S6 --> S5[S5: 演算]
    S5 --> S7[S7: 表示]
  
```



【図4】

